



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Nacional de La Plata

Trabajo final de carrera

“ESTUDIO DE FLAVANONA COMO POTENCIAL PLAGUICIDA DE ÁFIDOS EN CULTIVO DE LECHUGA”

Alumno: Florencia Barberis

Número de Legajo: 27152/1

DNI: 35551219

Correo electrónico: barberis.flor@gmail.com

Teléfono: (02346) 15 457478

Director de Tesina: Dr. Gustavo Romanelli

Codirectora de Tesina: Dra. Érica Tocho

Lugar de Trabajo: CISaV, Cátedra de Genética

Fecha de entrega: 27 de mayo de 2019

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Generalidades del cultivo de lechuga	4
Características de <i>Aulacorthum solani</i>	5
Flavanona	8
Objetivos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Preparación de flavanona	14
Material vegetal	15
Poblaciones de <i>Aulacorthum solani</i>	15
Preparación de las disoluciones	16
Determinación del efecto fitotóxico en la germinación de semillas de lechuga.	17
Determinación del efecto fitotóxico en plántulas.	18
Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de inmersión	19
Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de aplicación tópica.	20
Determinación de interacción planta-insecto mediante bioensayo de repelencia o selección.	21
Análisis estadístico	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Determinación de efecto fitotóxico en la germinación de semillas de lechuga.	23
Determinación del efecto fitotóxico en plántulas.	24
Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de inmersión.	26
Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de aplicación tópica.	27
Determinación de interacción planta-insecto mediante bioensayo de repelencia o selección.	28
CONCLUSION	30
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

El presente Trabajo Final de carrera consiste en determinar si la flavanona obtenida mediante la síntesis química, atendiendo a los principios de la Química Verde, presenta actividad insecticida o repelente sobre el pulgón de la papa (*Aulacorthum solani*) en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). Para ello, se determinó el efecto fitotóxico de la aplicación de flavanonas en plantas de lechuga en diferentes estados fenológicos, se evaluó el efecto letal a través de distintas vías de exposición: por un lado se realizó la aplicación tópica sobre el cuerpo del áfido y por otro lado, se los expuso a la alimentación de discos foliares inmersos en las disoluciones. Por último, se valoró el impacto del compuesto en la interacción planta-insecto mediante bioensayos de selección. En todos los casos, se probaron distintas concentraciones de flavanonas utilizando acetona como solvente y Tween 20 como tensioactivo.

Los resultados obtenidos indican que la flavanona no se comporta como un plaguicida ya que no genera efecto letal en el áfido en estudio. Sin embargo, ante la presencia de discos foliares expuestos al compuesto, el insecto se muestra inquieto y caminador con tendencia a alejarse del vegetal tratado, con lo cual se podría inferir que existe un efecto repelente del compuesto.

Por último, se destaca que no se evidenciaron síntomas de fitotoxicidad sobre semillas y plántulas de lechuga (estado de tercera hoja verdadera), lo que indicaría que podría ser aplicado sobre los vegetales sin interferir en su crecimiento, si se comprobare su acción de repelencia.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del cultivo de lechuga

La producción hortícola en Argentina se encuentra distribuida prácticamente a lo largo de toda su extensión. De los 34 millones de hectáreas con cultivos agrícolas en nuestro país, aproximadamente 500.000 hectáreas (o sea, 1,47 %, incluyendo las legumbres) corresponden a cultivos hortícolas, tanto a cielo abierto como bajo cubierta. Anualmente se producen alrededor de 10 millones de toneladas de hortalizas y legumbres, destinadas en un 93% al mercado interno mientras que el porcentaje restante se exporta (Fernández Lozano, 2012). De la superficie total de hortalizas implantadas, Buenos Aires, Córdoba y Mendoza concentran aproximadamente el 50% de la misma (García, 2011).

El territorio sur del AMBA (Área Metropolitana Buenos Aires) registra hoy la mayor superficie cubierta del país con 5.461 ha de invernaderos, siendo La Plata el principal municipio productor con 4.642 ha. El fuerte dinamismo que presentó esta región en los últimos 15 años, se explica principalmente por la instalación de un modelo de producción de hortalizas de hoja de alta productividad durante todo el año, en el cual la lechuga (*Latuca sativa* L.) ocupa el primer lugar (INTA-CMCBA, 2018). En lo que respecta al Cinturón Hortícola de La Plata, la lechuga representa el 90% de los cultivos de invernaderos junto con el tomate, la espinaca y el pimiento, con rendimientos de 18 tn/ha (Del Pino, 2019).

Este nuevo modelo de producción bajo cubierta fue desplazando en forma paulatina a la producción a campo. En cuanto a las variedades, esta tecnología ha posibilitado imponer lentamente la lechuga Mantecosa durante todo el año y también se cultivan la lechuga Criolla, Francesa, Morada y Capuchina (INTA-CMCBA, 2018).

La lechuga es una especie herbácea anual, de la familia de las Asteráceas. Se consume en todo el mundo y constituye el cultivo de hoja más importante para el consumo en ensaladas y sándwiches. Esta planta está compuesta principalmente por agua (95%), siendo el resto de sus componentes fibras, azúcares, minerales (potasio, hierro, fósforo), vitaminas (E, B1, B2, B6), ácidos orgánicos (ácido fólico), entre otros, por lo que su valor nutritivo es limitado. En lo que respecta a su ciclo, pueden distinguirse dos etapas: una fase vegetativa y otra reproductiva. Durante la primera etapa se produce la formación de la planta que luego se cosecha para su consumo, proceso en el cual requiere climas templados a frescos con temperaturas medias mensuales entre 13°C y 18°C, beneficiándose con amplitudes térmicas durante el día y la noche de 3-12°C. En cuanto a

las condiciones edáficas se prefieren suelos ligeros con alto contenido de materia orgánica, buen drenaje y pH entre 6-7. La duración de esta etapa puede ir de 35-40 días en primavera verano y de 55-60 días en invierno (Del Pino, 2019).

Con respecto a las plagas que afectan a la lechuga podemos encontrar principalmente a los pulgones, entre ellos *Myzus persicae*, *Nasonovia ribisnigri* y *Aulacorthum solani* (Vasicek et al., 2002). Estos insectos son importantes no solo por los daños que causan al alimentarse del contenido celular sino también porque son transmisores de virus.

Se entiende como plaga agrícola a cualquier organismo cuya densidad poblacional supere determinado límite por encima del cual las pérdidas económicas ocasionadas al productor (ya sea por la reducción en el rendimiento y/o calidad del producto) justifiquen el costo de adoptar medidas para su control. Este límite artificial se conoce como Nivel de Daño Económico (NDE) y es definido como el mínimo número de organismos que causarían un daño económico (Pedigo, 1989). A su vez, es de relevancia el concepto de Umbral Económico (UE) o Umbral de Acción (UA) el cual se define como la densidad poblacional de determinado organismo a la cual se debe implementar una acción de control a fin de evitar que se produzca un daño económico (Horn, 1988). El UE se determina en función del NDE y es menor que éste. En base a lo expuesto, la categoría plaga se establece como tal en un sentido económico, no estando asociado a un significado ecológico.

Características de *Aulacorthum solani*

El pulgón de la papa, *Aulacorthum solani* se clasifica de la siguiente forma:

Orden: *Hemiptera*

Suborden: *Sternorrhyncha*

Superfamilia: *Aphidoidea*

Familia: *Aphididae*

Los hemípteros pueden ser identificados por las estructuras particulares del aparato bucal. Las mandíbulas y las maxilas son modificadas en estiletes de longitud variable y están envueltas por un labio multisegmentado. Las mandíbulas externas y las maxilas,

yuxtapuestas por sus superficies externas, forman los canales de salivación y alimentación (Forero, 2008) (Figura 1).

El nombre *Sternorrhyncha* se refiere a la posición del rostro (complejo bucal), el cual tiene su base entre el primer par de coxas y en su posición de descanso es colocado a lo largo de la superficie ventral del cuerpo (Blackman y Eastop, 1984).

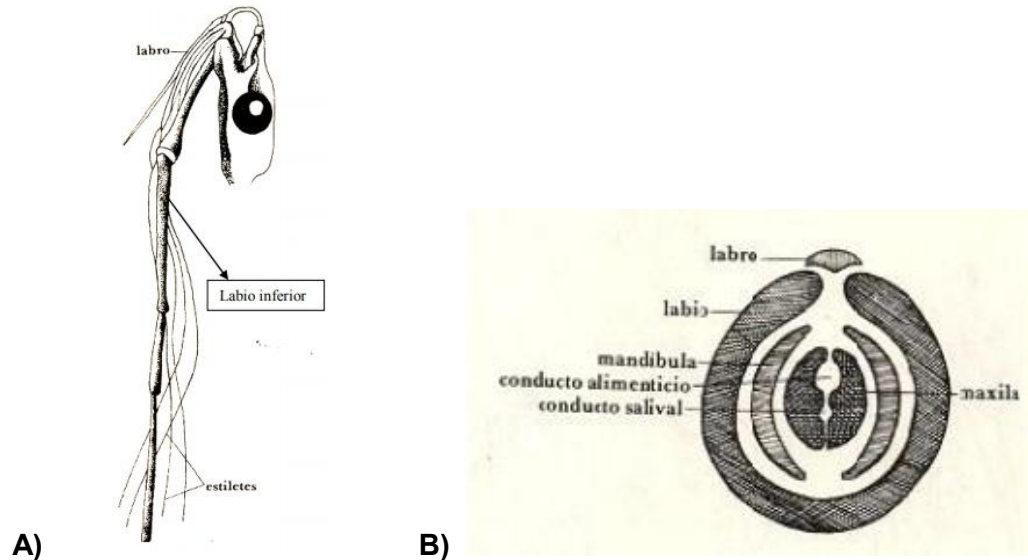


Figura 1: A) aparato bucal picador-suctor, B) corte transversal del estilete. (Etcheverry y Herrera, 1972)

Aulacorthum solani posee forma aperada y color entre verde claro y amarillento, que tiene un tamaño de 2 mm, bastante mayor que otros áfidos. Las hembras ápteras adultas se caracterizan por tener tubérculos antenales paralelos entre sí con un engrosamiento de color oscuro entre los artejos. Además, presenta sifones semitransparentes terminados en un reborde oscuro similar a la boca de una botella y con una mancha de un verde más oscuro que el del cuerpo en la base de los sifones, característica propia de esta especie. Los caracteres descritos también se manifiestan en las ninfas de forma menos acusada. Sin embargo, las hembras aladas son muy diferentes, con antenas, patas y sifones en tonos más oscuros y líneas transversales de diseño variable en el abdomen. A diferencia de otros áfidos, *A. solani* se caracteriza por tener mayor movilidad, presentándose como un insecto activo y caminador. Otra particularidad es que desarrolla colonias poco compactas (Sola, 2015) (Figura 2).

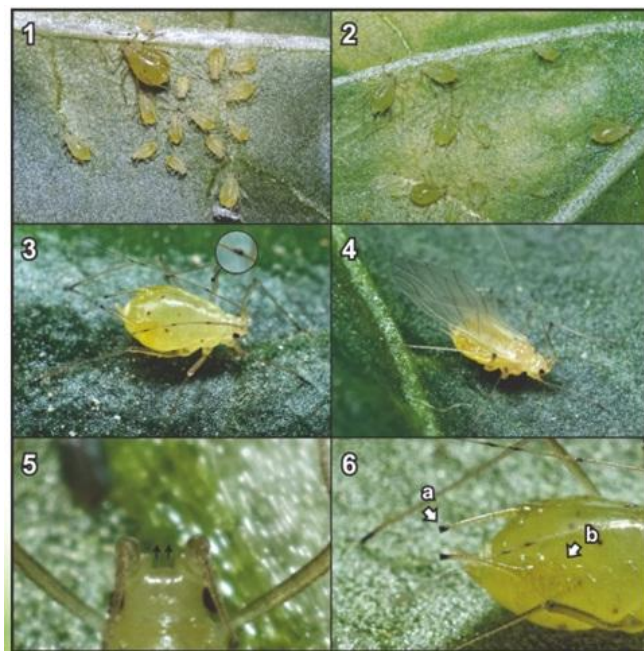


Figura 2: *Aulacorthum solani*. 1.- Forma amarillenta. 2.- Forma verdosa. 3.- Adulta áptera, obsérvese el engrosamiento oscuro entre los artejos de las antenas. 4.- Adulta alada. 5.- Detalle de los tubérculos antenales paralelos. 6.- Detalle de los sifones: 6a) Engrosamiento en forma de botella del extremo distal. 6b) Mancha ligeramente más oscura en la base del cornículo o sifón (Sola, 2015).

Se presenta de manera ocasional en el cultivo de lechuga, sin embargo, es una especie muy polífaga. Su carácter como plaga se debe, en parte, a los daños directos provocados por su alimentación. Tanto las ninfas como los adultos, mediante su aparato bucal succionan los jugos celulares e inyectan saliva tóxica provocando decoloraciones y deformaciones en zonas apicales de las hojas y en caso de ataques en frutos provoca manchas oscuras, tal es el caso en los frutos del pimiento. En ambos casos reduce el valor comercial del producto o impide su comercialización (Sola, 2015). También genera daños indirectos, entre ellos la producción de melaza que consiste en la excreción del exceso de azúcar sobre las hojas, desluciendo su aspecto y tornándolas pegajosas, atrayendo hormigas, permitiendo el desarrollo de hongos, además de interferir con las funciones de fotosíntesis y de respiración, lo cual en conjunto le quita valor comercial a las partes comestibles (Cermeli, 1987). Por último, cabe mencionar que numerosos trabajos destacan la importancia de *A. solani* en su papel como vector de enfermedades virósicas, entre ellos Harris y Maramorosch (1974) y Stoltz et al. (1997).

Si bien este áfido no es considerado una plaga primaria en el cultivo de lechuga, resulta interesante el estudio de dicha interacción en presencia de una flavanona obtenida por síntesis de bajo impacto ambiental, para evaluar modificaciones en las plantas, en la biología del insecto o en los patrones de selección o repelencia sobre los sitios de alimentación.

Flavanona

El manejo sanitario de cultivos hortícolas que se realiza en Argentina está basado principalmente en un manejo convencional que implica un control químico sin realización de un diagnóstico previo (monitoreo de plagas), con aplicaciones frecuentes de plaguicidas convencionales, generalmente de amplio espectro, de manera preventiva (Cappello y Fortunato, 2008). Como contrapartida a este sistema, surge la Horticultura Orgánica, adoptada por varios productores, cuyo objetivo se basa en un manejo ecológico del suelo, la rotación y diversificación de cultivos (Del Pino, 2002) y en la preservación de los ecosistemas, con especial interés en la conservación de los enemigos naturales e insectos benéficos. Además, existe una mayor conciencia y exigencia por parte de la sociedad y de los consumidores hortícolas, quienes demandan sistemas de producción más sustentables y amigables con el medio ambiente.

Surge a partir de estas consideraciones el concepto de “Manejo Integrado de Plagas” (MIP), el cual utiliza una serie de herramientas en forma conjunta y complementaria, es así que para la toma de decisiones se basa en la selección y uso de los controles culturales, biológicos, químicos y otras tácticas de control de plagas, que sean compatibles con el ambiente, económicamente viables y socialmente aceptadas, para mantener poblaciones de plagas a niveles tolerables (Shenk y Kogan, 2003). Se propone no eliminar los organismos plaga sino mantener su densidad poblacional a niveles tolerables por debajo del NDE.

A continuación, se indican las técnicas de control empleadas en el MIP (Greco et al., 2002):

Control biológico, se basa en las relaciones tróficas existentes en un ecosistema. Implica la utilización de enemigos naturales para mantener la densidad poblacional de una plaga por debajo de su NDE o sin variaciones importantes de su densidad poblacional. Los enemigos

naturales incluyen a depredadores, parasitoides o patógenos (hongos, protozoos, nematodos, bacterias y virus).

Técnicas culturales, entendido como la implementación de prácticas de manejo que modifican los agroecosistemas de modo que sean menos favorables al desarrollo de plagas. Entre estas prácticas se encuentran: la preparación del suelo, la asociación de cultivos, establecimiento de cultivos barrera y cultivos trampa, fecha de siembra y cosecha, rotación de cultivos, entre otras.

Uso de variedades resistentes: clásicamente, esta técnica consiste en el uso de variedades de cultivo obtenidas mediante cruzamientos y métodos de selección artificial.

Control químico basado en la utilización de compuestos de origen inorgánico u orgánico, de fuente sintética o natural para el control de plagas

Otras técnicas: actualmente están muy difundidas diferentes técnicas de control de plagas como la liberación de machos estériles y el uso de feromonas (control etológico).

Como se dijo anteriormente en la Horticultura el control químico es el principal, y muchas veces el único, método de control de plagas utilizado que conlleva la aplicación de grandes cantidades de sustancias químicas nocivas para el ambiente.

Las consecuencias negativas del mal uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura, motivó la búsqueda de nuevos compuestos insecticidas. En este contexto nace la Química Verde, la cual fue adoptada como una propuesta novedosa para reducir y/o eliminar los problemas ambientales derivados de actividades industriales. Según la US Environmental Protection Agency (EPA), la Química Verde vincula el “uso de la Química para la prevención de la contaminación y el diseño de productos químicos y procesos benéficos para el ambiente” (Anastas y Kirchhoff, 2002; Manley et al., 2008; Pájaro Castro y Verbel, 2011).

Paul Anasta y John Warner (1998) en su libro “Green Chemistry: Theory and Practice”, plantean una serie de principios que constituyen el pilar de la Química Verde y ayudan a conseguir sus objetivos:

1. Prevenir la creación de residuos. Resulta más útil evitar o reducir la producción de desechos que tratarlos o limpiarlos tras su formación.
2. Maximizar la economía atómica. Los métodos sintéticos deben maximizar la incorporación de cada material utilizado en el proceso.
3. Realizar síntesis química menos peligrosa. Consiste en elaborar procesos que generen la mínima toxicidad e impacto ambiental.
4. Diseñar productos y compuestos menos peligrosos. Los productos químicos se deben diseñar con una toxicidad mínima.
5. Utilizar disolventes y condiciones seguras de reacción. Las sustancias auxiliares de los procesos químicos (disolventes, tampones, aditivos de separación, entre otros), han de ser inocuas y reducirlas al mínimo.
6. Diseñar para la eficiencia energética. Debe minimizarse los requerimientos energéticos para los procesos químicos, los cuales serán evaluados por su impacto medioambiental y económico, y reducirlos al máximo, intentando llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente.
7. Utilizar materias primas renovables. Los materiales de partida utilizados deben proceder de fuentes renovables, en la medida en que sea económica y técnicamente factibles.
8. Evitar derivados químicos. La síntesis debe diseñarse con el uso mínimo de grupos protectores para evitar pasos extras y reducir los desechos.
9. Utilizar catalizadores. Debe emplearse catalizadores lo más selectivos y reutilizables posibles.
10. Diseñar productos fácilmente degradables al final de su vida útil. Los productos químicos han de ser diseñados de tal manera que al culminar su función no persistan en el ambiente y puedan degradarse a derivados inertes o biodegradables.

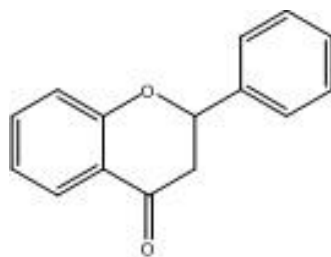
11. Monitorear los procesos químicos en tiempo real para evitar la contaminación. Debe crearse sistemas de control y monitorización continuos para prevenir la producción de sustancias peligrosas durante los procesos.

12. Prevenir accidentes. Diseñar los procesos químicos, utilizando métodos y sustancias que reduzcan los accidentes (emisiones, explosiones, incendios, entre otros), y minimizar los daños cuando se produzca un accidente.

Por lo expuesto es que se buscan compuestos que sean eficaces para la plaga que se quiere controlar, pero que sean inocuos para el hombre y afecten lo menos posible al ambiente. Ambas características parecen combinarse en los productos naturales sintetizados por las plantas, también llamados insecticidas botánicos (Pérez et al, 2013), que pertenecen principalmente al grupo de los compuestos secundarios (provenientes del metabolismo secundario de las plantas), dentro de los cuales se encuentran los flavonoides.

Como una alternativa a la utilización de productos naturales sintetizados por la propia planta, la Química Verde permite la síntesis de compuestos análogos a ellos con el propósito de lograr procesos más sustentables y en mayores volúmenes.

Los metabolitos secundarios derivados de la vía de los fenilpropanoides se destacan por cumplir diversas funciones ecológicas. Los flavonoides, son un grupo de compuestos fenólicos que derivan de la vía combinada fenilpropanoide + malonato. Su estructura se caracteriza por tener un esqueleto que consta de dos anillos de seis átomos de carbono (designados con las letras A y B) unidos mediante un puente de tres átomos de carbono, que por lo común forma un tercer ciclo (anillo C). Dependiendo del grado de oxidación del anillo central, se obtienen las diferentes estructuras de cada compuesto flavonoide en particular. En el Esquema 1 se muestra a modo de ejemplo la estructura de la flavanona.



Esquema 1: Estructura de la flavanona.

Dentro del grupo de los flavonoides se destacan las siguientes estructuras chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianidinas (Ringuelet y Viña, 2013).

La funcionalización con grupos –OH de fenoles se originan mediante las siguientes vías: por un lado la ruta del ácido shikímico, el cual es precursor para la formación de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina. Por otro lado, la ruta biosintética de los flavonoides que comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) se obtiene el ácido trans-cinámico, luego el cual es transformado en ácido *p*-cumárico por hidroxilación del anillo aromático; que acción de una coenzima-A-ligasa lo transforma en *p*-cumaril coenzima-A, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal. Los flavonoides como se indicó previamente, se sintetizan por la denominada vía fenilpropanoide-malonato. El nuevo anillo aromático se forma a partir de tres residuos de acetato un segundo anillo aromático se une a la porción fenilpropanoide de la molécula. La chalcona, sintetizada por la enzima chalcona sintasa (CHS) a partir de *p*-cumarilCoA y tres moléculas de malonilCoA, es un precursor en la síntesis de los flavonoides. La estructura de la chalcona es convertida a flavanona por acción de la enzima chalcona isomerasa. La flavanona es el compuesto precursor de los restantes flavonoides (Hemingway y Karchesi, 1989).

Las plantas liberan varios productos químicos para disuadir y atraer a los insectos, en algunos casos depredadores naturales de los herbívoros que se alimentan de ellas o plagas de las plantas. Los flavonoides se han citado entre las sustancias químicas que regulan la oviposición de algunos insectos, estimulando o evitando que ocurra (Nishida, 1994; Tabashnik, 1987; War et al., 2012), y la alimentación de los insectos. Su presencia puede alterar la palatabilidad de las plantas, reducir su valor nutritivo, disminuir la digestibilidad o incluso actuar de forma tóxica (Mierziak et al., 2014).

Además de su función protectora contra insectos herbívoros, se relacionó la síntesis de flavonoides con la resistencia a patógenos, así como las interacciones simbióticas con microorganismos (principalmente con bacterias) y en las interacciones alelopáticas con otras plantas. Entre éstas últimas, su síntesis en las raíces se correspondió con la inhibición de la germinación y el crecimiento de las plántulas (Star, 1980; Mierziak et al., 2014).

Objetivos

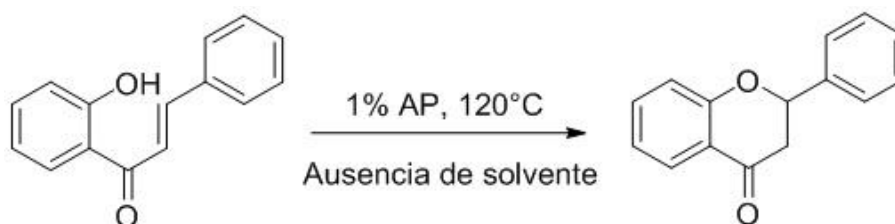
El objetivo general del trabajo consistió en evaluar la actividad del compuesto flavanona como potencial plaguicida de áfidos en el cultivo de lechuga. Para lograrlo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Sintetizar a través de un procedimiento de bajo impacto ambiental flavanona, utilizando un catalizador sólido reciclable ausencia de solvente.
2. Determinar el efecto fitotóxico de la aplicación de flavanonas en plantas de lechuga en diferentes estados fenológicos.
3. Evaluar la actividad insecticida (efecto letal) de las flavanonas a través de distintas vías de exposición en bioensayos de laboratorio.
4. Evaluar el impacto de los compuestos de estructura flavanonas en la interacción planta-insecto mediante bioensayos de selección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de flavanona

La flavanona utilizada para los ensayos fue obtenida mediante un procedimiento de bajo impacto ambiental en ausencia de solvente empleando un catalizador de estructura tipo Preyssler (AP) (Esquema 2).



Esquema 2: Síntesis de flavanona

Operaciones generales: los productos químicos utilizados fueron de grado analítico y empleados sin posterior purificación. El producto fue identificado por la determinación del punto de fusión del compuesto el cual fue determinado por el método del capilar y la caracterización espectroscópica se llevó a cabo por la determinación de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. Los resultados fueron similares a los reportados por Attarde et al. (2014) en "Synthesis and evaluation of chalcone derivatives for its alpha amylase inhibitory activity".

Síntesis del sustrato de partida (2-Hidroxichalcona): se llevó a cabo a partir de acetofenona y benzaldehído empleando NaOH acuoso como catalizador, siguiendo el procedimiento descrito por Bamoharran et al. (2006) en "Preyssler catalyst, $[\text{NaP5W30O110}]^{14-}$: a green, efficient and reusable catalyst for esterification of salicylic acid with aliphatic and benzylic alcohols".

Síntesis del catalizador (Ácido de Preyssler, $\text{H}_{14}[\text{NaP5W29MoO110}]$): se siguió esencialmente un procedimiento descripto Bamoharran et al. (2006).

Síntesis de flavanona: se mezclaron íntimamente 1 mmol de 2-hidroxiacetofenona con 1% mmol de ácido de AP. Se calentó a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 120 minutos; el grado de

avance de la reacción se controló por CCD. Finalizada la reacción, se añadieron 5 ml de tolueno y se filtró en caliente para separar el catalizador; este se lavó con el mismo solvente (2x2 ml). La fase orgánica reunida se lavó con NaOH 3M (2x 5 ml) y luego con H₂O (2x5ml). Se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se obtuvo un sólido que fue purificado por cristalización en metanol, obteniéndose un rendimiento de 83 %. El catalizador recuperado fue secado en tambor desecador a vacío hasta peso constante.

Material vegetal

Para los ensayos se usó lechuga criolla variedad gallega (*Lactuca sativa* var. *longifolia*), que es una de las más utilizadas por los productores hortícolas de la región.

Poblaciones de *Aulacortum solani*

Se utilizó una población de áfidos replicada y mantenida en una cámara de cría en condiciones controladas (T° 15°C +/- 2; HR 70% y Fotoperíodo de 12:12 L:O), ubicada en la cátedra de Zoología Agrícola de la FCAyF.

Los individuos fueron recolectados en cultivos de lechuga sin antecedentes de exposición a plaguicidas comerciales o en cultivos orgánicos, tanto en condiciones de campo como bajo cubierta, en diferentes establecimientos del Cinturón Hortícola Platense (CHP). Algunos de los establecimientos donde se realizaron los muestreos fueron La Anunciación, Establecimiento de producción orgánica ubicado en Abasto, partido de La Plata y la Escuela Agraria N°1 “Dr. Alejandro Korn” ubicada en Ruta 36 y 485 S/N, Abasto, La Plata, Buenos Aires. Los insectos colectados a campo fueron mantenidos en cuarentena para detectar posibles enfermedades o parasitismos.

Luego fueron criados sobre plantas de lechuga ubicadas en jaulas plásticas, con ventilación en la tapa para evitar la fuga de los mismos y permitir la aireación. En esta población se realizaron los cuidados necesarios para obtener y criar el número de insectos adecuados para llevar a cabo los diferentes ensayos.

El mantenimiento de las poblaciones consistió en la obtención de plantas de recambio que incluyeron siembra, riego y cuidado de las mismas. Se realizó una limpieza semanal de las jaulas plásticas con reposición de las plántulas de lechuga que sirvieron como alimento de los insectos y del papel sobre el cual se apoyaron las mismas, así como

la eliminación de individuos muertos, alados y mudas y el mantenimiento de la humedad óptima, entre otras.

Preparación de las disoluciones

Se buscó evaluar el uso de compuestos fenilpropanoides como potenciales plaguicidas mediante bioensayos de dosis respuesta sobre plantas e insectos plaga. Para ello fue necesario realizar la correcta formulación de los principios activos (o droga técnica) para una adecuada viabilidad de aplicación del producto.

La mayoría de las sustancias que se emplean como plaguicidas no pueden usarse en el estado en que son extraídas o sintetizadas. Por ello se debieron preparar mezclas o formulaciones que consisten en el o los componentes activos en la concentración correcta, con el agregado de sustancias auxiliares. Entre estas últimas sustancias se encuentran los solventes y los tensioactivos (o emulsionantes). Un solvente o disolvente es una sustancia capaz de disolver a otra y formar una solución. Para aplicar esa solución es necesario un vehículo, que en general en las aplicaciones de plaguicidas es el agua (Murace, 2008).

Para la realización de este trabajo se optó por disolver la flavanona empleando acetona, la cual es un solvente polar que pertenece al grupo de los COV (Compuestos Orgánicos Volátiles). El carácter volátil de éste disolvente hace que se evapore rápidamente al tomar contacto con el aire, por ello se utiliza para disolver sustancias insolubles. La bibliografía cita a la acetona en muchas formulaciones de uso agrícola (Hummelbrunner e Isman, 2001).

Para decidir el método más apropiado para la preparación de las concentraciones, se ensayaron diferentes modos de realizarlas. Por un lado, se realizaron diluciones seriadas comenzando por la preparación de mayor concentración. También, se intentó preparar cada una de ellas por separado, con el agregado del agua incorporando gota a gota hasta determinar el volumen de saturación antes de la aparición de la formación de un precipitado. A su vez se probaron diferentes volúmenes de acetona como disolvente, con la incorporación de agitación mecánica y una fuente de calor. La razón por la cual se efectuaron dichas pruebas fue que si bien se sabe que algunos compuestos fenólicos son hidrosolubles (Ringuelet y Viña, 2013), se observaba insolubilidad con formación de un precipitado blanco (Figura 3) al entrar en contacto el soluto con el agua y que el mismo disminuía al aumentar el volumen del disolvente, por lo que se debió buscar una relación

apropiada entre la acetona y el agua que permita la disolución de la flavanona pero que no afecte a la planta.



Figura 3: Precipitado que forma la flavanona al entrar en contacto con el agua.

Para la elaboración del formulado se utilizó una balanza de precisión para el pesaje del soluto, según las concentraciones a obtener. Las diluciones se prepararon con agua destilada, 0,1% v/v de Tween 20 como agente tensioactivo, y acetona como solvente, como se mencionó anteriormente.

Se probaron distintas concentraciones: 100, 200, 400, 500 ppm para los ensayos de aplicación en plántulas, germinación y repelencia o atracción. Para las evaluaciones de aplicación tópica e inmersión de los discos foliares se utilizaron 100, 500, 1000, 10000 ppm. Además, se incorporaron los correspondientes controles.

En cada experimento y repetición fue preparada la solución fresca.

Determinación del efecto fitotóxico en la germinación de semillas de lechuga.

Se realizaron en cajas de Petri, en las que se ubicaron 20 semillas de lechuga distribuidas en forma uniforme sobre un disco de papel absorbente. Se agregaron, con una pipeta de modo cuidadoso para evitar la formación de burbujas de aire, 2 ml de las diluciones 100 ppm, 200 ppm (ambas preparadas con 0,5 ml de acetona y 49,5 ml de agua destilada más el tensioactivo obteniendo así un volumen final de 50 ml), 400 ppm, 500 ppm (en estos dos casos preparados con 2 ml de acetona y 48 ml de agua destilada más Tween 20), controles de 0,5 y 2 ml de acetona y otro control solo con agua destilada. El motivo por el cual se utilizaron diferentes volúmenes de acetona en los ensayos, se debió a que, como se dijo anteriormente, la flavanona al entrar en contacto con el agua genera un

precipitado, que se acentúa al ir aumentando el peso del soluto en las concentraciones más altas. En estos casos se aumentó el volumen de acetona para que se produzca una adecuada disolución y evitar que suceda este fenómeno.

Las cajas de Petri fueron embolsadas para evitar la pérdida de humedad y conservadas en oscuridad en una estufa a temperatura constante de 24°C durante 120 horas. Se realizaron dos repeticiones, cada caja de Petri representó una de ellas (R1 y R2). Las evaluaciones consistieron en determinar el % de germinación a las 24 horas de iniciado el ensayo, contabilizando las semillas germinadas en relación al total. A las 120 horas se midió con una regla milimetrada el crecimiento del hipocótilo y de la radícula, cuya sumatoria corresponde al crecimiento total. En ese momento se dio por finalizado el ensayo y el material vegetal fue descartado (Figura 4).

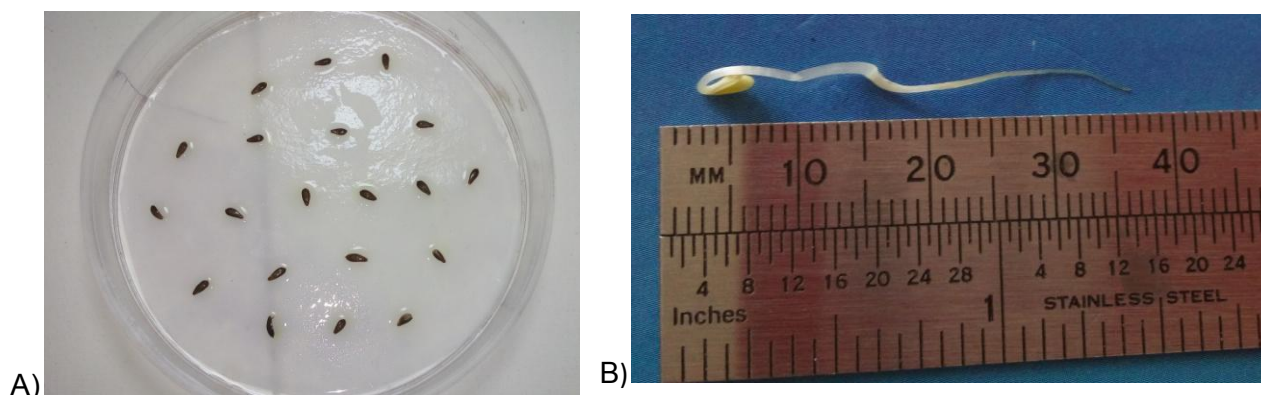


Figura 4: A) Ensayo de germinación en caja de Petri, B) Medición con regla milimetrada.

Determinación del efecto fitotóxico en plántulas.

Se buscó evaluar modificaciones en los parámetros de crecimiento de plantas de lechuga expuestas a la aplicación de flavanonas en diferentes dosis. Los parámetros a observar fueron: enanismo, retraso o aumento en el crecimiento, clorosis, marchitamiento, pérdida de turgencia, muerte, etc. Cabe aclarar que los insectos no estuvieron presentes en esta prueba.

El ensayo fue conducido en un invernáculo cerrado y aireado, en condiciones naturales de luz y temperatura. Se utilizaron bandejas de germinación (speedling) con tierra fértil. Se realizó el tratamiento con plantas en el estado de tercera hoja verdadera. El

mismo consistió en asperjar las plantas con las disoluciones usando un aplicador manual hasta el punto de escurrimiento o chorreo. Se probaron 20 plantas por tratamiento.

A los 6 y 12 días de la aplicación se realizó la evaluación de los tratamientos que consistió en las observaciones visuales de modificaciones en los parámetros morfológicos de las plantas expuestas al compuesto, que evidencien algún tipo de síntoma de fitotoxicidad, en relación a los respectivos testigos.

Se determinó el contenido de clorofila con un medidor automático SPAD-502 Minolta (Milton Keynes) en la última hoja de cada planta, cuyos valores fueron expresados en Unidades SPAD. Al finalizar el ensayo se determinó el peso seco aéreo (PS) de las plantas para cada tratamiento. Para ello, las plantas fueron cortadas por la base, colocadas en sobres de papel y secadas en una estufa a 65° C durante 72 h. Luego se midió el peso seco con una balanza de precisión Mettler Toledo, expresando el resultado en miligramos (mg).

Las concentraciones probadas fueron: 100, 200, 400, 500 ppm, C1 y C2 (agua más tensioactivo y agua más tensioactivo y 1 ml de acetona, respectivamente). Las diluciones se prepararon de la siguiente manera: las de 400 y 500 ppm de flavanona con 4 ml de acetona, como disolvente y para las de 100 y 200 ppm se usó 1ml. En todos los casos se llevó a un volumen final de 100 ml completando con agua destilada y 0,1% v/v de Tween 20.

Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de inmersión

El mismo consistió en sumergir un círculo foliar de 1 cm de diámetro durante 10 segundos en las distintas concentraciones de flavanonas, las cuales fueron 100, 500, 1000 y 10000 ppm. En este caso el compuesto fue disuelto en acetona, sin el agregado de agua destilada y se utilizó el tratamiento con acetona como control negativo y como control positivo un insecticida comercial (PUNTO 3,5 sc Gleba Jardín, preparado según las indicaciones del marbete del producto). Luego los discos se secaron en forma natural durante 20 minutos y cada uno de ellos se ubicó en el centro de una caja de Petri sobre un papel de filtro de 2 x 2 cm que fue embebido en agua con el objetivo de mantener húmedo el disco foliar. Sobre el círculo se colocaron 4 pulgones de edad similar (adultos o ninfas grandes), con el objetivo de forzar su alimentación (Faraone et al., 2015).

Durante la cría de los pulgones se advirtió que se encontraban escondidos dentro de los cogollos de la lechuga, donde había cierto grado de oscuridad y que al ser expuestos a la luz adquirirían una actitud inquieta, aumentando su movilidad. Teniendo en cuenta este comportamiento se decidió realizar, tanto el ensayo de inmersión como los demás bioensayos que implicaran la presencia de áfidos, en ambientes con luminosidad controlada. De esta manera se buscó realizar una mejor manipulación evitando el estímulo de la luz durante el tiempo del ensayo.

Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de aplicación tópica.

Para determinar la existencia o no de mortalidad se realizó el método seguido por Pérez (2016), que consistió en la aplicación tópica de 0,2 μ l de la solución correspondiente sobre el tórax del insecto. La aplicación se realizó usando una microjeringa de 10 μ l provista de un dispensador manual Hamilton® (Figura 5). Se probaron concentraciones de 100, 500, 1000, 10000 ppm preparadas como se menciona en el ensayo de inmersión. El control negativo se realizó con acetona y el positivo con el insecticida.

Previo a la aplicación se colocaron 3 adultos o ninfas mayores en cajas de Petri con un disco foliar de lechuga de 2 cm de diámetro sin tratar, sobre un papel de filtro humedecido que permitió mantener la turgencia de los mismos. Se colocó las cajas con los insectos en la heladera durante 5 minutos para disminuir su movilidad (Salazar et al, 2015).

Las evaluaciones de los individuos vivos y muertos se realizaron a las 24, 48 y 72 horas desde la aplicación. Todos los tratamientos se repitieron tres veces, con 3 unidades de experimentación (cajas de Petri), con 3 insectos por cada caja.



Figura 5: microjeringa Hamilton®

Determinación de interacción planta-insecto mediante bioensayo de repelencia o selección.

Este ensayo se basa en la libre elección de los insectos por el sitio de alimentación. Es decir, se busca determinar si existe inhibición o atracción y asentamiento del insecto por efecto de la flavanona.

En este caso las disoluciones se prepararon usando 0,5 ml de acetona para 100 y 200 ppm y 1 ml para las concentraciones 500 y 400 ppm, llevando a un volumen final de 50 ml con agua destilada más 0,1% v/v de Tween 20.

El ensayo consistió en cortar discos de hojas de lechuga de 2 cm de diámetro que fueron sumergidos durante 10 segundos en las distintas soluciones de flavanona y en acetona (0,5 y 2 ml) para saber si el disolvente influye en el efecto sobre los pulgones o si solo se debe al compuesto. En todos los casos se contrastó con un control de agua destilada más el tensioactivo. La totalidad de los discos se dejaron secar en forma natural durante 20 minutos. Un disco tratado y uno control se ubicaron en cajas de Petri separados entre sí sobre un trozo de papel de filtro húmedo que evitó la deshidratación de las hojas vegetales durante el transcurso del ensayo (Figura 6). Opuestos a los discos se ubicaron, con un pincel de cerdas finas, 10 hembras ápteras adultas o ninfas grandes (correspondientes a los últimos estadios ninfales).



Figura 6: Ensayo de selección o repelencia. El disco de la izquierda pertenece al control, mientras que el de la derecha es el tratado.

A las 24 y 48 horas se realizaron evaluaciones que consistieron en contabilizar el número de insectos en cada disco foliar (o en la zona cercana al mismo). Cada caja de Petri equivalió a una unidad de experimentación, con 10 insectos cada una.

Los datos se expresaron como índice de repelencia $(IR) = (T - C) / (T + C)$; donde T= disco tratado y C= disco control. El IR varía entre +1 (máxima atracción) y -1 (máxima repelencia). IR=0 significa que no existen diferencias entre la elección de los discos, y por lo tanto, la distribución es aleatoria (Alsogaray et al, 2013).

Análisis estadístico

Para la mayoría de los bioensayos se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado.

Cada bloque experimental (bioensayo) estuvo conformado por los tratamientos controles y las unidades experimentales representadas por cajas de Petri, ya sea con semillas o insectos según el bioensayo específico (al menos 2 cajas por bloque). Cada bloque fue repetido dos veces en forma no simultánea.

Los datos de los ensayos de germinación, pulverización en plántulas y repelencia o selección fueron analizados con el programa estadístico STATISTICA versión 10 (2011), mediante Análisis de la Varianza (ANOVA). Con el propósito de determinar diferencias entre los valores promedios se aplicó la prueba de Tukey ($P < 0,05$). En los casos de incumplimiento de los supuestos del análisis de la varianza, se llevaron a cabo transformaciones de los datos, con el fin de normalizar los valores y de homogeneizar la varianza del error. Para los ensayos de inmersión y aplicación tópica se utilizó el análisis Probit, el cual está diseñado para ajustar un modelo de regresión en el cual la variable dependiente, que caracteriza un evento, puede tomar dos valores, para éstos casos la variable fue insecto vivo o muerto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de efecto fitotóxico en la germinación de semillas de lechuga.

El análisis estadístico de los datos revela diferencias significativas en el % de germinación a las 24 hs ($F=12,1034$; $g.l=6$; $p=0,002165$). Se observa que en el control con agua y con 0,5 ml acetona, germinaron cerca del 50% de las semillas con diferencias significativas con el tratamiento de 100 ppm en el cual germinaron más del 70 % (Gráfico 1). Sin embargo, con las concentraciones mayores no se observó esta tendencia, sino un menor porcentaje de la germinación. Según los resultados encontrados, no se podría atribuir a la flavanona un comportamiento de inhibición o estímulo determinante de la germinación. Sin embargo, se ha observado que en la segunda medición correspondiente al crecimiento de la radícula e hipocótilo (120 horas), la mayoría de las semillas habían germinado, incluso las semillas del control (solo con agua). Por ello, este retraso no se lo puede atribuir tanto al efecto de la flavanona como de la acetona.

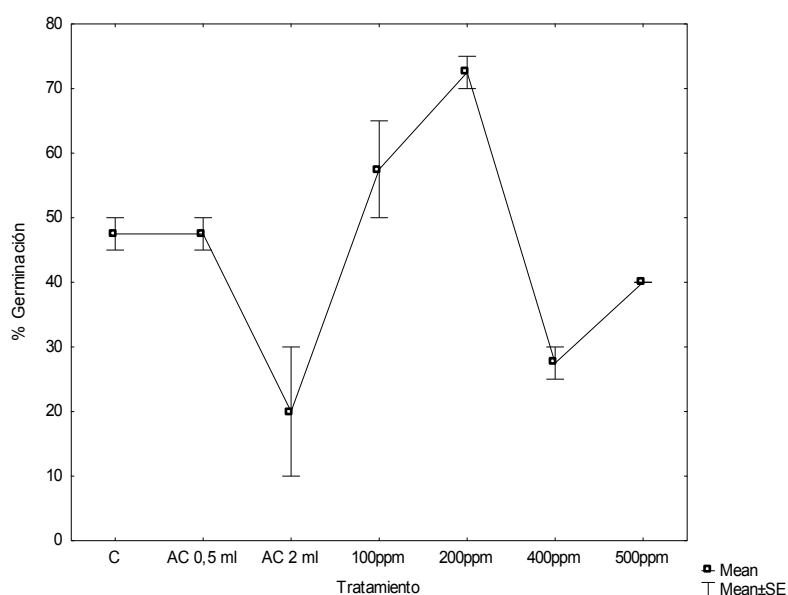


Gráfico 1: Promedio de los porcentajes de germinación, medidos a las 24 h.

Cuando se procedió a la medición, se observó que la longitud total no presenta diferencias entre los controles y los tratamientos con flavanona ($F=1,512$; $g.l=6$; $p=0,175901$). Sin embargo, las mediciones por separado de las radículas ($F=13,187$; $g.l=6$;

$p=0,000000$) e hipocótilos ($F=13,893$; $g.l=6$; $p=0,000000$) mostraron diferencias entre ambos controles (Ac 0,5 ml y Ac 2 ml) y los tratamientos con flavanona (Gráfico 2).

Estas diferencias pueden deberse a un crecimiento compensatorio que realiza la plántula, con mayor aumento de la longitud de la radícula sobre el crecimiento del hipocótilo en presencia de los tratamientos con flavanona.

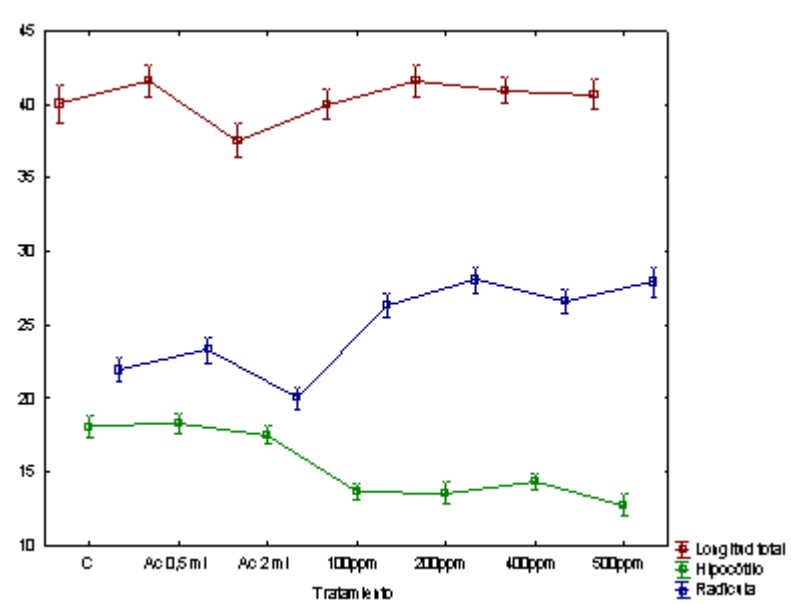


Gráfico 2: Promedios de crecimientos medidos en milímetros, a las 120 h.

Determinación del efecto fitotóxico en plántulas.

Al momento de la evaluación, no se observaron visualmente síntomas de fitotóxicidad en las plantas tratadas con flavanona. Es decir, las plántulas expuestas al compuesto no manifestaron síntomas tales como diferente coloración, presencia de clorosis o necrosis, deformación de los apéndices foliares, diferencia de tamaño u otra característica distintiva con sus respectivos controles expuestos a agua.

En lo que respecta a la determinación del contenido de clorofila realizado con el SPAD no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos probados y el control ($F= 1,856$; $g.l=5$; $p= 0,107500$) (Gráfico 3). Esto indicaría que la flavanona no produce síntomas cloróticos manteniendo el verdor en las hojas. En tanto el peso seco tampoco se vio afectado por la presencia del compuesto estudiado ($F= 1,4454$; $g.=5$; $p= 0,222451$) (Gráfico 4).

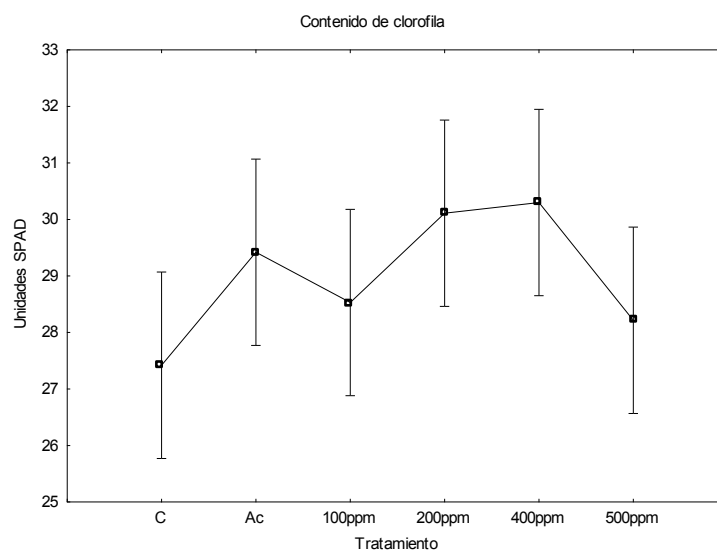


Gráfico 3: Promedio del contenido de clorofila expresado en unidades SPAD, luego de 15 días de la aplicación de los tratamientos.

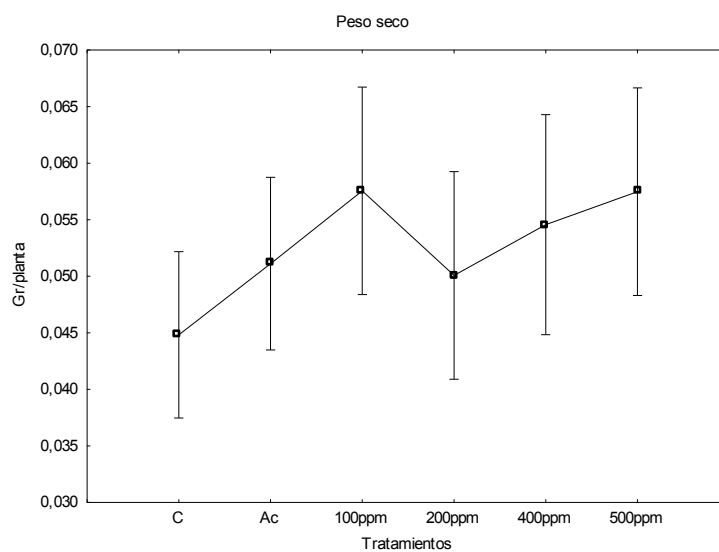


Gráfico 4: Promedio del peso seco de las plantas de lechuga luego de 15 días de la aplicación de los tratamientos.

Como conclusión se puede decir que la flavanona no afecta el crecimiento y el desarrollo de las plantas de lechuga y de ser utilizado como plaguicida no alteraría la fisiología de la planta.

Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de inmersión.

El análisis estadístico determinado con Probit indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos probados a las 24 y 48 horas ($p= 0,7224$ y $p= 0,4504$ respectivamente).

En la evaluación a las 48 horas de la inmersión de los discos, se pudieron registrar individuos muertos en los tratamientos, aún en las concentraciones más bajas (100 ppm). Sin embargo, en la misma evaluación en el control con acetona se registró una mortalidad cercana al 50%. Este resultado, impide dilucidar el efecto de la acetona y de la flavanona en la mortalidad de los insectos, por ello no se manifiestan diferencias estadísticas confiables entre los tratamientos.

Así mismo se pudo apreciar que los discos al ser inmersos en acetona se deshidrataban (Figura 7), condición que se agravó a las 48 horas del tratamiento (Figura 8). Es decir, la mortandad podría ser una consecuencia de la falta de alimentación de los insectos al encontrarse los discos foliares en mal estado. Se estaría en presencia de muerte por inanición y no por efecto del compuesto en sí.



Figura 7: Discos recién tratados. Se observa la diferencia entre los discos tratados con el insecticida comercial (C+) y los que fueron sumergidos en acetona.

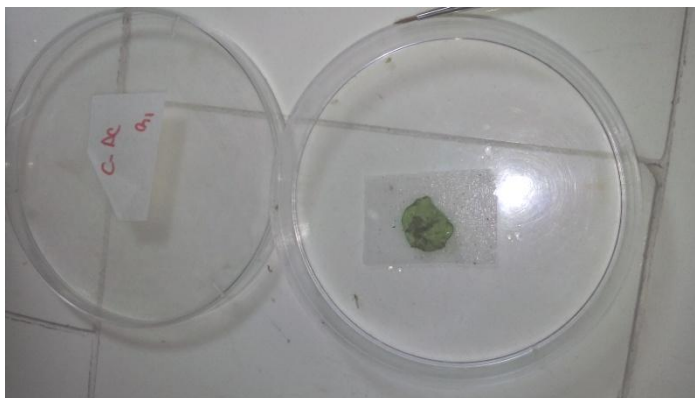


Figura 8: Disco a las 48 horas de la inmersión.

Determinación del efecto letal o la mortalidad de los organismos mediante el método de aplicación tópica.

Se realizaron dos ensayos con la aplicación de volúmenes diferentes sobre el cuerpo del insecto. El primero de ellos, siguiendo el método de Pérez (2016) se realizó utilizando una microjeringa que produce un volumen de gota de 0,5 μ l. En el trabajo de Pérez se realizaron estudios de la actividad de compuestos fenilpropanoides sobre la polilla del tomate (*Tuta absoluta*). Este insecto presenta un tamaño superior al del pulgón *A. solani* (entre 2 y 3 mm contra 7-8 mm de *T. absoluta*) y en consecuencia el volumen de 0,5 μ l resultó suficiente para realizar el ensayo. Sin embargo, ese mismo volumen aplicado sobre el cuerpo del pulgón resultó ser excesivo, cubriéndolo en su totalidad en lugar de quedar limitado al tórax del mismo. Por ello, se repitió el ensayo con un volumen de gota de 0,2 μ l, para lograr un menor volumen restringido al tórax del pulgón.

Los análisis estadísticos con el análisis Probit, al igual que en el ensayo de inmersión, no evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles en ninguna de las 3 mediciones realizadas a las 24, 48 y 72 horas ($p= 0,9738$, $p= 0,4248$ y $p= 0,3211$ respectivamente). Estos resultados revelan que la flavanona en las concentraciones probadas no origina un efecto letal sobre el insecto mediante la aplicación tópica.

Como conclusión podemos destacar que la flavanona no tiene efecto como plaguicida sobre el pulgón *A. solani*, en las concentraciones evaluadas. Es probable que, a concentraciones superiores, pueda observarse un incremento de la mortalidad de los

insectos. Sin embargo, el aumento excesivo de la dosis del producto lo haría inviable para su uso como plaguicida en el agro ya que podría generar toxicidad en el ambiente.

Cabe destacar la problemática que surgió a la hora de realizar la aplicación en el tórax del insecto al trabajar con gotas muy pequeñas. Además, a este se le suma la alta movilidad que presenta el pulgón de la papa, que es acentuada al ser expuestos a la luz. Es importante remarcar que, a pesar de haber utilizado la técnica de enfriamiento (colocar los insectos por un breve tiempo en la heladera) para tratar de tranquilizarlos y de haber aplicado el compuesto en un ambiente con luz tenue, estas medidas no fueron suficientes para eliminar la movilidad de los insectos. Por este motivo, sería interesante pensar en otra estrategia al momento de realizar este tipo de ensayos con áfidos. Ensayos biológicos con insectos de distintas características, no presentan los inconvenientes mencionados. Tal es el caso de Pérez (2016) quien utilizó larvas de *Tuta absoluta* en el estadio cuatro, próximas a pupar, estadio que se caracteriza por la poca a nula movilidad, lo cual facilita una adecuada aplicación.

Determinación de interacción planta-insecto mediante bioensayo de repelencia o selección.

Los datos obtenidos de las mediciones realizadas a las 24 h de la aplicación, ($F= 0,569013$; $g.l.= 5$; $p= 0,722670$) y a las 48 horas ($F= 0,979048$; $g.l.= 5$; $p= 0,469007$) no arrojaron diferencias significativas en lo que respecta al lugar de preferencia de alimentación. Es decir, este ensayo tal como está planteado en este trabajo no permitiría diferenciar el comportamiento de atracción o repelencia de la flavanona sobre el pulgón de la papa. Sin embargo, a pesar de los resultados estadísticos no significativos, pudo observarse en los insectos un comportamiento aleatorio al momento de elegir el sitio de alimentación que no se puede definir si se debe o no a la presencia de la flavanona o de la acetona, dado que ambos compuestos son altamente aromáticos.

La flavanona sintética con la que está empapado el disco foliar, al ser colocado en un ambiente pequeño, cerrado y sin ventilación como la caja de Petri, podría generar aromas o sustancias volátiles que distorsionarían el comportamiento selectivo del insecto. Para evitar esta situación, podría utilizarse un recipiente de mayor tamaño y con ventilación para que haya circulación de aire y las sustancias gaseosas tengan salida.

Además, se pudo observar que, si bien muchos de los insectos no murieron, tampoco permanecieron en el disco foliar expuesto a las flavanonas, sino que se

encontraron caminando por los alrededores o las tapas de la caja de Petri, lo cual hace suponer que en una situación a campo esta sustancia tendría actividad antialimentaria o de repelencia. Se podría especular que de no existir otro alimento cerca, los insectos mueran de inanición o, de existir otra fuente alimentaria se trasladen a ella.

En cuanto al estado de los discos se advirtió que, a diferencia de lo ocurrido con el ensayo de inmersión, los mismos permanecieron turgentes durante la realización del ensayo (Figura 9). Esta condición puede atribuirse al uso de una disolución con mayor volumen de agua.



Figura 9: Discos a las 48 h. Disco A control con agua destilada, B tratado con la disolución.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos a lo largo de los diferentes ensayos realizados nos llevan a concluir que la flavanona no se comporta como un plaguicida ya que ha demostrado no generar efecto letal en *Aulacorthum solani*. Sin embargo, ante la presencia de discos foliares expuestos al compuesto, el insecto se muestra inquieto y caminador con tendencia a alejarse del vegetal tratado y sin establecerse en sitios de alimentación fijos. Este comportamiento lleva a pensar que existiría algún tipo de repelencia causada por la flavanona sobre el pulgón de la papa. No obstante, deberían repetirse los ensayos de selección modificando la metodología, utilizando recipientes de mayor tamaño y con ventilación para impedir el efecto aromático de la sustancia sobre el comportamiento selectivo del pulgón.

Es necesario mencionar que se trata de un insecto que se caracteriza por su alta movilidad al ser expuestos a la luz, mientras que se ha observado que, durante su mantenimiento en las macetas de cría, buscan alojarse en las partes del vegetal protegidas y con cierta oscuridad (el interior del cogollo, hojas internas entre, otras). Para minimizar su movilidad, se intentó trabajar en presencia de luz roja, pero dada la dificultad se hicieron las determinaciones en habitaciones con poca iluminación.

Por último, es importante destacar que no se evidenciaron síntomas de fitotoxicidad sobre semillas y plantas de lechuga (estado de tercera hoja verdadera), lo que demuestra que, de comprobarse su acción de repelencia las flavanonas podrían ser aplicadas sobre los vegetales sin alterar o afectar el crecimiento.

PRESENTACIONES

Como información adicional, es importante destacar que determinados resultados contenidos en este trabajo fueron presentados y publicados en:

- F. Barberis; E. Tocho; M. S. Tacaliti; C. Margaría; M. Ricci y Romanelli G. 2018. "Efecto de la flavanona en la interacción planta – insecto". XVI Jornadas Fitosanitarias Argentinas.
- F. Barberis; E. Tocho; M. S. Tacaliti; C. Margaría; M. Ricci; D. M. Ruiz y G. P. Romanelli. 2019. "Preparación sustentable de flavanona y estudio de su efecto repelente sobre el pulgón de la papa en plántulas de lechuga". XXXII Congreso Argentino de Química. ISBN 978-987-47159-0-6. 297pp
- Barberis, F.; Tocho, E.; Tacaliti M. S.; Margaría, C.; Ricci, M.; Ruiz, D.; Romanelli G.P. 2019. "Síntesis de bajo impacto ambiental de flavanona y su efecto sobre *Aulacorthum solani* en plantas de lechuga". Revista electrónica Investigación Joven (ISSN 2314-3991). 5 (2): 13-15.

BIBLIOGRAFÍA

- Anastas P., and Kirchhoff M. 2002. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. En: Acc. Chem. Res.35: 686- 694.
- Anastas P., Warner John C. 1998. Green Chemistry: Theory and Practice.
- Attarde M., Vora A., Varghese A. y Kachwala Y. 2014. "Synthesis and evaluation of chalcone derivatives for its alpha amylase inhibitory activity". Organic Chemistry: An Indian Journal, 10: 192-204.
- Bamoharram F.F., Heravi M.M., Roshani M., Jahangir M. y Gharib A. 2006. "Preyssler catalyst, [NaP5W30O110]14-: a green, efficient and reusable catalyst for esterification of salicylic acid with aliphatic and benzylic alcohols". Appl. Catal. A Gen. 302: 4247.
- Blackman R.L. y Eastop V.F. 1984. Aphids on the world's crop: an identification and information Guide, Willey. 466 pp.
- Cappello V. y Fortunato N. 2008. Plaguicidas en el territorio bonaerense: información toxicológica, ecotoxicológica y comportamiento ambiental. Dirección Provincial de Recursos Naturales, Programa Gestión Ambiental en Agroecosistemas, OPDS, Buenos Aires.
- Castro Pájaro N., OliberoVerbel J. 2011. Química Verde: un nuevo reto. Ciencias e Ingeniería Neogranadina.21(2): 169-182pp
- Cermeli, M. 1987. Control de áfidos plagas en Venezuela. En: Curso de áfidos. Artículos selectos sobre áfidos y su importancia económica en la Agricultura de Centroamérica. CATIE. Panamá. 20-35pp.
- Del Pino M. 2002. La agricultura orgánica. En: Sarandón SJ (Ed.) Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable. Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina. 177-188pp.

- Del Pino M. 2019. Apuntes del curso “Horticultura y floricultura”, FCAyF-UNLP.
- Etcheverry M. y Herrera J. 1972. Curso teórico-práctico de entomología. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. 385 pp.
- Faraone N., Hillier N., Christopher Cutler. 2015. Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). PLOS ONE. DOI:10.1371/journal.pone.0127774. 1-12pp.
- Fernández Lozano J. 2012. La producción de hortalizas en Argentina. Secretaría de Comercio Interior. Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. En: https://www.academia.edu/23974120/La_produccion_de_hortalizas_en_argentina
- Forero Dimitri. 2008. The systematics of the Hemiptera. Revista Colombiana de Entomología 34, 1: 1-21pp.
- García M. 2011. Análisis de las transformaciones de la estructura agraria hortícola platense en los últimos 20 años. El rol de los horticultores bolivianos. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Greco N. M, Sánchez N. E. y Pereyra P. C. 2002. Principios de manejo de plagas en una agricultura sustentable. En: Sarandón SJ (Ed.) *Agroecología*. El camino hacia una agricultura sustentable. Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina. 251-274pp.
- Harris K. y Maramorosch K. 1977. Aphids as virus vectors. N. York. Academic Press. 559 pp.
- Hemingway RW and Karchesi JJ. 1989. *Chemistry and significance of condensed tannins*. Springer, USA.

- Horn D. 1988. Ecological approach to pest management. Cap. 2. Springer. Netherlands.
- Hummelbrunner L. and Isman M. 2001. Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae) J. Agric. Food Chem., 49, 715-720pp.
- INTA-CMCBA. 2018. Boletín de frutas y hortalizas. En: <http://www.mercadocentral.gob.ar/sites/default/files/docs/boletin-INTA-CMCBA-76-lechuga.pdf>. Último acceso Mayo de 2019
- Manley J., Anastas P., and Cue B. 2008. Frontiers in Green Chemistry: meeting the grand challenges for sustainability in R&D and manufacturing. En: J. Cleaner Prod. 16: 743-750 pp.
- Mierziak J., Kostyn K., y Kulma A. 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. Molecules. 19:16240-16265 pp.
- Murace. 2008. Archivo: Formulación de plaguicidas. Apunte de Protección Forestal, UNLP. En: http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/15376/mod_resource/content/0/Terapeutica_funguicidas_-_insecticidas/Microsoft_Word_-_Formulaciones_de_plaguicidas_Apunte_1_de_Prot_Forestal.pdf
- Nishida R. 1994. Cap 36. Oviposition stimulant of a Zeryntine swallowtail butterfly, *Luehdorfia japonica*. Phytochemistry .873–877pp.
- Pedigo L P. 1989. Entomology and Pest Management. Cap. 7. Springer.
- Pérez M.E, Ruiz D., Schneider M. Autino J.C. y Romanelli G. 2013. La química verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas agrícolas. Revista ciencia en desarrollo 4(2):83-91pp.

- Pérez M. E. 2016. Preparación sustentable y evaluación de actividad biológica de fenilpropanoides frente a la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Tesis. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Argentina.
- Ringuelet J y Viña S. 2013. Cap.4. Compuestos fenólicos. *En: Productos Naturales Vegetales*. Ed. Edulp. 91-150pp.
- Salazar R., Torres P., Serrato B., Domínguez M., Alarcón J. y Céspedes C. 2015. Insect Growth Regulator (IGR) effects of *Eucalyptus citriodora* Hook (Myrtaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.14 (5): 403 – 422 pp.
- Shenk M y Kogan M. 2003. Rol de los insecticidas en el manejo integrado de plagas. *En: Silva Aguayo G y Hepp Gallo R (Eds.), Bases para el manejo racional de insecticidas*. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía / Fundación para la Innovación Agraria, Chillán. 31-49pp.
- Sola S. 2015. Pulgones grandes: *Macrosiphum euphorbiae* y *Aulacorthum solani*. *Revista Cajamar*, 12. *En:* <https://www.cajamar.es/pdf/bd/agroalimentario/innovacion/investigacion/documentos-y-programas/012-pulgones-1446548205.pdf>. Ultimo acceso: Marzo de 2018.
- Star A. E. 1980. Frond exudate flavonoids as allelopathic agents in *Pityrogramma*. *Bull. Torrey Bot. Club*.107:146–153pp.
- Stoltz R.L, Gavlak R.G y Halbert S. 1997. Survey of potential aphid vectors of potato (*Solanum tuberosum* L.) virus diseases in the Matanuska valley, Alaska. *J. Veg. Crop. Prod.* 3 (I):27-36.
- Tabashnik B.E.1987. Plant secondary compounds as oviposition deterrents for cabbage butterfly, *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *J. Chem. Ecol.* 13, 309–316pp.

- Vasicek, A, La Rossa R, Paglioni A. 2002. Aspectos biológicos y poblacionales de *Nasonovia ribisnigri* y *Aulacorthum solani* (Kalt.) (Homoptera: Aphidoidea) sobre lechuga. Pesquisa Agropecuaria Brasileira-EMBRAPA (en prensa).
- War, A. R, Paulraj M. G, Ahmad T, Buhroo A. A, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma H. C. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signal. Behav.7, 1306–1320pp.